

平成15年度厚生労働科学研究  
動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 (H15-リスク-002)

報告書

研究代表者

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・  
安全性生物試験研究センター・薬理部)

研究班員

田中憲穂 (食品薬品安全センター・秦野研究所)  
豊田英一 (日本化粧品工業連合会・技術委員会)  
森本雍憲 (城西大学・薬学部)

研究協力者

安藤正典、徳永裕司  
(国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等医療技術リスク評価研究事業

動物実権代替法の開発の開発と利用に関する調査研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大野 泰雄

平成16年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 ----- 9  
大野泰雄  
(資料)

### II. 分担研究者報告

1. 光毒性試験代替法の評価とバリデーション -----22  
大野泰雄

資料1) 赤血球光溶血試験プロトコール

資料2) 資生堂より提案のあった酵母光生育阻害試験及び光溶血試験を用いた光毒性試験バリデーションの一次評価報告

資料3) 光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書

資料4) 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム

2. 代替法についての情報収集と解析、代替法の評価 -----83  
豊田英一

資料 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026-0035.

資料 2) CTPA News update, Seventh Amendeimnt, February 6, 2003.

資料 3) CTPA News update, Seventh Amendeimnt, March 3, 2003.

資料 4) The Rose Sheet, Vol.24 No34, p7(2003), Seventh Anendment Animal Testing Ban Disputed By France Manufacuturers.

資料 5) ATLA, 30, 261-262 (2002)

Alternatives to Animal Experiments, Goodbye ECVAM, Hello FRAME

資料 6) FRAME News, Issue No.55, August 2002,

CHAIRMAN OF RAME RETIRES AS HEAD OF ECVAM

資料 7) ATLA, 31, 473-481 (2003)

ECVAMS's, Response to The Changing Political Environt for Alternatives; Consequences of the European Union Chemicals and Cosmetics Policies.

資料 8) ATLA, 31, 87-87 (2003) ECVAM News & Views

資料 9) ATLA, 31, 379-379 (2003) ECVAM News & Views

資料 10) ATLA, 31, 471-471 (2003) ECVAM News & Views

資料 11) ATLA, 31, 551-551 (2003) ECVAM News & Viewx

- 資料 12) The SCCNFP'S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation (5th Revision) Adopted by the SCCNFP during the 25th plenary meeting of 20 October 2003. pp18-30
- 資料 13) European Chemicals bureau-testing-methods
- 資料 14) ICCVAM Guidelines for the Nomination and Submission of New, Revised, and Alternative Test Methods; NIH Publication No.03-4508, September2003
- 資料 15) Federal Register Vol.68, No.220, 14/11/2003, p64636 Department of Health and Human Services
- 資料 16) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/corrode.htm>  
CORROSITEX®: A Validated and Accepted Dermal Corrosion Test Method for Classifying Substances According to the UN Packing Groups,
- 資料 17) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invitro.htm> In vitro methods for assessing acute systemic toxicity
- 資料 18) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/eyeirrit.htm> In vitro screening test methods for severe eye irritants
- 資料 19) ATLA, 31, 233-233 (2003) News and Views

3、第4次 OECD guideline, skin absorption; in vitro method (案) -----292  
-TEWL を用いた皮膚 integrity 試験の妥当性-  
森本 雅憲

4、3次元ヒト皮膚培養モデルを用いた経皮吸収試験に関する研究-----300  
大野 泰雄  
研究協力者 安藤 正典  
徳永 裕司

5、細胞を用いる代替試験法の開発 -----308  
田中 憲穂

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----315

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 -----316

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）  
総括研究報告書

動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究

主任研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

研究要旨

酵母の生育阻害及び赤血球の溶血を指標とする *in vitro* 光毒性試験法バッテリーについての提案資料を評価委員会で詳細に検討し、申請データの信頼性を確認した。また、施設内バリデーションのレベルでは false negative が少なく、難水溶性物質にも適応可能な方法であると評価された。そこで6施設の協力を得て、多施設バリデーションを実施した。その結果の一次評価では1施設を除き再現性は比較的良く、陽性物質の識別率の高い方法であると判定された。今後、評価委員会等で更に評価を行う予定である。

*In vitro* 経皮吸収試験においては皮膚試料の Integrity が担保するための経皮的な水分損失 (TEWL) の妥当性を検討し、適切に処置したテープ stripping による障害の程度を TEWL が反映していることが明らかになった。なお、TEWL は角質層の4～5層の剥離までは損傷に対して敏感ではないという性質を知った上で利用する必要がある。コラーゲンゲルあるいはコラーゲンスポンジ上に作成した角質層を有する三次元培養皮膚モデルにおける薬物の透過パターンはモルモットの剥離皮膚での透過速度と大きく異なり、三次元皮膚培養モデルを実験動物代替法の動物の皮膚モデルとして、物質の透過実験に用いることは困難であると思われた。

代謝系を導入した *in vitro* 細胞毒性試験系について検討した結果、CHL 細胞を用い、染色体試験に用いられている S9mix が効果的であることが明らかになった。

2009年に予定されている化粧品の安全性評価のための EU 域内での動物実験禁止と動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止に向けて、欧米では ECVAM と ICCVAM の協力体制を構築し、代替法開発を促進している。また、評価された代替法は積極的に行政試験へ取り入れている。

新規代替法として、放射性物質を用いない皮膚感作性試験 LLNA 改良法と皮膚三次元モデルを用いる皮膚腐食性試験法が提案された。研究班での検討の結果、評価すべきとされ、その準備を開始した。

分担研究者

豊田英一 日本化粧品工業連合会  
技術委員会

森本雅憲 城西大学薬学部

田中憲穂 食品薬品安全センター  
秦野研究所

研究協力者

徳永裕司 国立衛研 環境衛生化学部

米国では ICCVAM を設立し、代替法の文献的評価とバリデーションを実施している。OECD では代替法を用いた試験法ガイドラインを複数作成中である。また、ECVAM と ICCVAM は代替法の取り入れについて相互にハーモナイズする方向で協調しており、内分泌かく乱化学物質試験法や Toxicogenomics などの新しい毒性評価方法についても対応している。このように欧米では代替法の開発・評価を着実に進めてきており、我が国でも早急に評価センターを立ち上げ、欧米と連携する必要に迫られている。

一方、代替法においては広い範囲の被験物質についてバリデーションを行い、試験法の performance とともに、得られる情報の種類や適用可能物質などについて明ら

A. 研究目的

動物実験については動物愛護団体等からの反対運動が活発に行われている。そこで EU では代替法センター (ECVAM) を設立し、代替法研究と評価を行ってきた。その成果を踏まえ、EU は 2009 年までに動物実験を行った原料を用いた化粧品の販売を禁止することに決定した。同様の目的のために

かにしておくことがその適正利用に必要である。しかし、多大な費用と時間がかかることから、全ての試験法についてわが国で開発し、バリデーションすることは不可能である。そこで、本研究においては我が国内外の代替法バリデーション情報を収集し、それを関連科学分野の専門家と行政担当者を含めた会議により総合的に評価する。また、適切な試験法が無いもの、あるいは既存の代替法が不十分なものについては、新たな試験法の開発あるいは既存の方法を改善することとした。今年度は皮膚吸収性試験、光毒性試験、及び細胞毒性試験について実験的検討を行った。更に、動物実験代替法に関する欧米の社会情勢および行政的な受け入れ状況について調査した。

## B. 研究方法

### B-1) 海外における代替法の現状の調査

情報収集は、過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ (SCCNFP, OECD, ECVAM, ICCVAM など) を定期的に検索するとともに EU については同地域の化粧品工業会である COLIPA、米国については CTFA との連繫を通じて実施した。その他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

### B-2) 新規代替法の評価

研究班による新しい代替法の評価希望の募集は日本動物実験代替法学会ホームページ及び同ニュースレターで行った。研究班では応募された試験法の概要を検討し、更に詳細な評価を行う価値があるか否か検討し、価値があると判定された方法については、日本動物実験代替法学会に評価の依頼を行う。

### B-3) 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーの評価

日本動物実験代替法学会では光毒性試験、統計専門家等により評価委員会 (委員長: 田中憲徳) を構成した。評価委員会では提案された光毒性試験バッテリーについて、提案者から提供された試験法 SOP、バリデーションデータ、公表論文、生データ等を基に 4 回の会議を催し、詳細に検討した。

審議結果は公開シンポジウムや研究報告書等で公開することを前提にしている。しかし、個人情報については事務局で保管し、漏洩防

止に留意した。

評価委員会の評価の結果、多施設でバリデーションする必要性とその価値があるとされたことから、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会 (委員長: 吉村 功) と協力し、多施設バリデーションを実施した。

試験法 SOP は評価委員会のコメントを基に、提案法を若干修正した。陽性対照物質は酵母光生育阻害試験では 8-methoxypsoralen (8-MOP)、光溶血試験では acridine を用いた。被験物質は EU/COLIPA のバリデーションで用いられ、光毒性の有無が示されている物質及びモルモットでの光毒性の有無が確認されている物質の中から光毒性陽性物質を 4 品目 (anthracene, amiodarone, chlorpromazine 塩酸塩, acridine)、陰性物質 5 品目 (chlorhexidine, bithionol, sodium lauryl sulfate (SLS), 6-methylcoumarin, 4-5-butyl-4-methoxydibenzoylmethane) を選考した。なお、bithionol と 6-methylcoumarin はモルモットでは陰性であったが、EU/COLIPA の報告ではヒトで陽性とされたものである。陽性対照以外の被験物質はコード化され、盲検体として参加 6 施設に配布した。薬物コードへの被験物質の割付は試験が終了し、データ提出を確認した後、開示された。

光源は Dr. H'nle 社の太陽光シミュレーター (SOL500) を用いた。

なお、参加施設代表者とバリデーション委員会委員、及び大野によりバリデーション実行委員会を組織し、吉村委員を委員長としてバリデーションの運営と情報交換、データ解析にあたった。

実験担当者は技術講習とデータの取り扱い等についての説明を 2 日間にわたり受けた。

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のそれぞれについて同じ濃度で 2 回繰り返し、それらの結果が大きく異なる場合は再度実験を行い、3 回目の試験結果に近い結果と合わせて当該試験での評価とした。また、バッテリーとしての総合評価法は下の表に示した。

		赤血球光溶血試験		
		陽性	疑陽性	陰性
酵母光 生育阻 害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	疑陽 性	陽性	疑陽性	疑陽性
	陰性	陽性	疑陽性	陰性

網掛け太字の部分が総合評価

なお、今回の報告はバリデーション実行委員会での予備的検討結果によるものであり、今後、この評価結果を評価委員会および評価会議に提出し、再度評価する予定である。

#### B-4) 皮膚吸収性試験

麻酔雄性ヘアレスラットの腹部皮膚を角質層を傷つけないよう十分注意しながら剃毛した。剃毛後皮膚(約 5 cm<sup>2</sup>)を摘出し、有効拡散面積 3.14cm<sup>2</sup>の縦型拡散セル(容積 16 mL)にマウントし、拡散セルを PBS (pH 7.4) で満たし、32℃で 1 時間水和させた。ブタ耳皮膚は食用ブタから摘出後 4 時間以内のものを屠殺場より入手し、ヘアレスラットと同様の方法で縦型セルにマウントし、水和させた。水和後、セロテープ<sup>®</sup> (SEKISUI) を皮膚に乗せ、D-square<sup>®</sup> (CuDerm Cop.) を用いて(約 200 g/cm<sup>2</sup>)、あるいは指で軽く擦り(5~10 g/cm<sup>2</sup>) 圧着させた後、速やかに一定の力でテープを剥がし、角質層を剥離した。ヘアレスラット皮膚では最大で 20 回まで、ブタ耳皮膚では 70 回まで tape stripping を行った。

transepidermal water loss (TEWL) の測定は恒温、恒湿に保ったアクリル製恒温箱の中で行った。stripping を行う前、及び stripping 後に TEWL を測定した。

#### B-5) 三次元皮膚培養細胞モデルを用いた皮膚吸収性試験

##### B-5-1) コラーゲンゲルおよびコラーゲンスポンジを用いた三次元培養皮膚モデルの構築

内径 60mm のシャーレに NHSF46 細胞 2 × 10<sup>5</sup> cells/well を含む DMEM-10%FBS 培養液 3.3mL とコラーゲンゲル(Cellmatrix Type I -A) 1.7mL を加え、放置し、固化したゲルをスパーテルで剥がした後、5%CO<sub>2</sub>

存在下 37℃で 1 昼夜培養した。その後、同培養液 5mL を加え、5%CO<sub>2</sub> 存在下 37℃で 6 日間培養した。培養液を Epi-Life-KG2:DMEM-10%FBS (1:1) 混液に換え、3 時間培養した。次に、培養液を Epi-Life-KG2 培養液に換え、更に 3 時間培養した。6-well マイクロプレートに入れたアッセイリングの上にコラーゲンゲルの線維芽細胞膜を移す。A431 細胞 2 × 10<sup>5</sup> cells/well を 0.2mL の Epi-Life-KG2 培養液に懸濁させた液をガラスリング内に加えた。1 時間後、Epi-Life-KG2 培養液 2mL を加え、24 時間培養する。その後、三次元培養用培地に交換し、更に 24 時間培養した。その後、培養液 1mL を除き、A431 細胞培養の表面を空気にさらしながら、11~13 日間培養し、三次元培養皮膚モデルを構築した。

コラーゲンスポンジを用いた三次元培養皮膚モデルもほぼ同様に作成した。詳細は分担報告を参照されたい。

##### B-5-2) 透過実験

三次元培養皮膚モデルが乗っているアッセイリングを Franz 型拡散セルに装着した。receptor 側に 20% PG 溶液、donor 側に透過試験用原液を加え、32℃の定温インキュベータ中に拡散セルを設置し、マグネチックスターラーで攪拌した。薬物を donor 側に加え、receptor 側に透過した試験物質を一定時間毎に測定した。

#### B-6) 細胞を用いる代替試験法の開発

##### B-6-1) 既存化学物質の代謝と細胞毒性

化学物質毒性試験報告 Vol.1-9 (化学物質点検推進連絡協議会、1994~2002) に掲載されている CHL 細胞を用いる染色体異常試験より、濃度設定試験のデータを集計して分析した。ラット肝 S9 による代謝活性化および代謝活性化をしない 6 時間処理のデータがあるものに関して、183 の化学物質について S9+ と S9- における IC<sub>50</sub> 値を調べ、IC<sub>50</sub> 値が求められない場合は、最高濃度における毒性を調べた。動物を用いた単回経口投与毒性試験および反復投与毒性のデータがあるものについては、その毒性値を併記した。それぞれの化学物質は S9 の有無による毒性反応から大まかに下記の 4 つのタイプに分類した。

- ① S9-, S9+ ともに毒性が見られない物質
- ② S9-, S9+ ともにほぼ同じ毒性を示す物質
- ③ S9+ で毒性が強くなる物質
- ④ S9+ で毒性が弱くなる物質

B-6-2) 代謝系導入における諸条件の検討  
BALB/c 3T3 細胞と CHL 細胞を用い、ニュートラルレッド取り込みを細胞毒性の指標とする方法に、ラット肝 S9 を用いる代謝系を組み合わせ、in vitro 細胞毒性試験を行った。

被験物質としては代謝を受けて毒性が増強され事が予測される物質：AFB<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>)、BP (benzo(a)pyrene)、CP (cyclophosphamide)、MCA (3-methylcholanthrene)、NDMA (N-nitrosodimethylamine)と、代謝を受けても毒性が増強しないと考えられる MMS (methyl methanesulfonate) を用いた。

#### (倫理面への配慮)

本実験は動物実験代替法の開発を目的としており、動物福祉の向上に資するものである。また、可能なものについては過去の動物実験データを用いた。動物を用いる実験では麻酔薬を用い、動物の苦痛が最小限になるようにした。

### C. 研究結果と考察

#### C-1) 新規代替法の評価

平成14年度は資生堂より資生堂より提案され、研究班で評価する価値があるとされた酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーについて、平成15年度に日本動物実験代替法学会に評価を依頼した。

平成15年度は皮膚感作性試験代替法として Local Lymph Node Assay (LLNA)の放射性同位元素を使用しない変法がダイセル(株)より提案された。また、大野より皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験法についての提案があった。研究班ではこれらについても評価する価値があるとし、日本動物実験代替法学会に評価を依頼した。

#### C-2) 海外における代替法の現状の調査

##### C-2-1) EU における動物実験禁止、代替法開発の動向

化粧品指令第7次改正が2003年3月11日付けで公布された<sup>1)</sup>。この後の動きとして、フランス政府および欧州化粧品原料連合会

(European Federation for Cosmetic Ingredients) によるEU議会およびEU理事会に対する提訴が挙げられる<sup>2)</sup>。この提訴の理由は、第7次改正の該当規制が不明瞭で、

加盟国批准の際に実施される自国法規制への取り込みは解釈の異なったものとなり、通商上の混乱を引き起こすとしている。現在、この提訴に対する判決はまだなされていない。また、化粧品指令第7次改正を受けた他の動きとしては、動物実験禁止のタイムスケジュール策定に向けた会議が挙げられる。EU委員会は2004年9月11日までに具体的な試験禁止に向けた活動計画を策定する責任を担っている<sup>3)</sup>。そのため、EU委員会は行政、学識経験者、産業界代表、動物愛護団体代表によるStakeholder Meetingを開催しているが、現時点ではその詳細は不明である。

ECVAM の諮問委員会である ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) がこれまでに承認した安全性試験(承認年月)は、3T3 NRU 光毒性試験(1997年11月)、EPISKIN™ 皮膚腐食性試験(1998年4月)、ラット TER 皮膚腐食性試験(1998年4月)、紫外線吸収剤への3T3 NRU 光毒性試験の適用(1998年5月)、皮膚感作性のための LLNA 試験(2000年3月)、EpiDerm™ 皮膚腐食性試験(2000年3月)、CORROSITEX™ 皮膚腐食性試験(2000年12月)、胎児毒性のための胚性幹細胞試験(2002年5月)、胎児毒性のための全胚培養試験(2002年5月)、胎児毒性のためのマイクロマス試験(2002年5月)<sup>3)</sup>であった。本年度は ESAC により承認された安全性試験はなかった。

ECVAMの新代表であるDr. Hartungは、開発すべき試験法への取り組みを明確化させるために重点領域を以下のように11項目に再編成した<sup>4)</sup>。

- 全身毒性(単回投与毒性、反復投与毒性、神経毒性、肺毒性、腎毒性、肝毒性、免疫毒性、血液毒性)
- 局所毒性(光毒性、皮膚腐食性、皮膚刺激性、眼刺激性)
- 感作性(皮膚感作性、吸入感作性)
- 発ガン性
- 生殖毒性
- トキシコキネティクス
- 環境毒性
- 科学的な情報サービス
- 定量的構造活性相関
- 生物学材料(発熱性物質試験)
- 戦略開発(in vitro 毒性試験やバリデーションにおける GLP、Good Cell Culture Practice (GCCP) のガイドライン、Toxicogenomic approach)



本年度 ECVAM により開催された Workshop は、in vitro 胎児毒性試験 (2003 年 1 月)<sup>5)</sup>、皮膚刺激性試験(2003 年 5 月)<sup>6)</sup>、急性毒性試験(2003 年 9 月)<sup>7)</sup>、免疫毒性試験 (2003 年 11 月)<sup>8)</sup>、Toxicogenomics(2003 年 12 月)<sup>9)</sup>であった。

EU 委員会の化粧品・非食品に関する科学諮問委員会 (SCCNFP) による化粧品成分の試験及び安全性評価のためのガイダンス 5 次改訂版が、2003 年 10 月 20 日の SCCNFP 25th plenary meeting で採択され、ホームページに公開された<sup>9)</sup>。このなかで SCCNFP による成分の安全性評価のために要求される安全性試験項目及び試験法の記載がある。

以下に成分の安全性評価のために提出が要求される基本情報 (試験法) を示すが、代替法の使用に関しては、2002 年 6 月 4 日に提出された SCCNFP の見解と同様であった。

- 急性毒性試験 (in vivo) : 固定用量法、急性毒性等級法、上げ下げ法
- 刺激性及び腐食性試験 : in vivo 皮膚刺激性試験法、in vitro 皮膚腐食性試験法 (ラット皮膚 TER 法、EPISKIN<sup>TM</sup>、EpiDerm<sup>TM</sup>、CORROSITEX<sup>TM</sup> 法、in vivo 粘膜刺激性試験 (Draize 法)、バリデーションはなされていないが有効な in vitro 試験法、Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) 法、赤血球及び NRU 法、HET-CAM 法)
- in vivo 皮膚感作性試験法 : LLNA 法、GPMT 法、Buehler 法
- 経皮吸収試験 : in vivo 経皮吸収試験、in vitro 経皮吸収試験
- in vivo 反復投与毒性試験 : 詳細略
- in vitro 変異原性/遺伝毒性試験 : 詳細略
- in vivo 発ガン性試験 : 詳細略
- in vivo 生殖毒性試験 : 詳細略。なお、全胚培養試験 (WEC)、マイクロマス試験 (MM) 及び胎児毒性幹細胞試験 (EST) の 3 種代替法は CMR 戦略において胎児毒性物質のスクリーニングに有用であるとされている。
- トキシコキネティクス
- 光毒性 : 3T3 NRU PT 法。なお、in vitro 光感作性試験はない。光変異原性及び光染色体異常誘発性についてはケースバイケースで評価する。
- ヒト試験結果

なお、化粧品指令第 7 次改正の第 4 a 条の

1(d)には、動物実験の禁止に係わるものとして、危険物質指令の別表 V (Council directive 67/548/EEC Annex V) 並びに EU 委員会と SCCNFP が協議して新たに作成する別表 IX がある<sup>1)</sup>。この危険物質指令の別表 V に係わるのが欧州化学局 (ECB ; European Chemicals Bureau) である。

ECB は、9 月 12 日に EU 危険物質指令に関係する試験法の状況を更新した<sup>10)</sup>。第 29 次修正の日程は明らかにされていないが草稿が完成しており、第 29 次修正に加えらるる予定の試験法は、以下の通り。

- 急性毒性試験 (固定用量法、急性毒性等級法)
- 皮膚刺激性/腐食性、
- 眼刺激性/腐食性、
- げっ歯類及び非げっ歯類における催奇形性試験
- 二世代生殖毒性試験
- LLNA (B.42, 新規)
- 神経毒性 (B.43, 新規)。

2004 年に検討が予定されている試験法には、in vitro 皮膚腐食性試験法 (TER 法、3 次元ヒト皮膚モデル)、in vitro 光毒性試験法 (3T3 NRU PT)、急性毒性試験 (上げ下げ法) がある。これらは全て、OECD ガイドラインとして承認されたものや ECVAM の ESAC により承認された試験法である。

#### C-2-2) 米国における代替法開発の動向

本年度は、新規代替法評価を ICCVAM に提案するための最新ガイドライン<sup>11)</sup>を ICCVAM のホームページに公開したことを 2003 年 11 月 14 日の官報 (Federal Register) に告示した<sup>12)</sup>。これは、1998 年 5 月に公表されたガイドラインの第 2 次改定版である。また、皮膚腐食性代替法 CORROSITEX<sup>TM</sup> のプロトコルを事例としてホームページに公開した<sup>13)</sup>。本プロトコルには、国連危険物質輸送専門委員会が定めた皮膚腐食性分類、PACKING GROUP I : 強腐食性、PACKING GROUP II : 中腐食性、PACKING GROUP III : 弱腐食性の 3 つに分類するための試験手順や判定基準などが記載されている。

また、ICCVAM は ECVAM と密接な情報交換を持ち、お互いが承認した試験法については、完備型の評価を実施しない評価促進プロセスを適用する。急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験については共同のバリデー

ションを実施中であり、Phase Ia 試験は 2002 年 11 月に、Phase Ib 試験は 2003 年 5 月に完了し、それらの結果を踏まえて再現性向上の観点からプロトコルを修正した Phase II 試験を 2003 年 11 月に完了した。現在、最適化されたプロトコルを使用した試験 Phase III の段階にある。

ICCVAM で現在進行中のものとしては、4 種の眼刺激性試験代替法(BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability)、HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane)、ICE(Isolated Chiken Eye Test)及び IRE (Isolated Rabbit Eye Test))のプレバリデーション計画がある<sup>14)</sup>。

一方、これまでに ICCVAM で評価された試験法で行政サイドにおいて採用されたものとしては、EPA による LLNA が挙げられるが、その他の試験法については採択の情報はない<sup>15)</sup>。

#### C-2-3) OECD の動向

昨年度は、LLNA ガイドライン 429 や皮膚刺激性/腐食性試験ガイドライン 404、眼刺激性/腐食性試験ガイドライン 405 が正式に認められている。皮膚刺激性/腐食性試験ガイドライン 404 や眼刺激性/腐食性試験ガイドライン 405 では皮膚刺激性や眼刺激性を評価する上で、皮膚腐食性を先に評価することが求められている。そのため、2002 年 5 月に専門家会議で承認された in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 430 (Transcutaneous Electrical Resistance Test)や in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 431 (Human Skin Model Test) がガイドライン化されれば、この方法を皮膚刺激性評価や眼刺激性評価に先行して実施することが要求される。

#### C-2-4) 日本における代替法開発の動向

本厚生労働科学研究班では、代替法開発の促進や評価された試験法のグローバルハーモナイゼーションを図る目的で、2003 年 8 月 6 日に、本研究班の大野班長、日本動物実験代替法学会副会長の板垣氏及び本研究班の国際情報担当である豊田が、ECVAM を訪問して共同研究の方向性の打合せを持った。その結果、ECVAM との間で以下のような非公式な協力関係についての了解を得た。

1)プロトコル、SOPs、Prediction model

については、資料があればコメント可能である。

2)試験結果の解析についても、資料があればコメント可能である。

3)日本においても、ECVAM と ICCVAM との共同バリデーションの様な形式ができればもっと良い。

4)基準に則ったデータを伴った試験ならば ESAC へ上程できるし、それについては協力しても良い。

日本動物実験代替法学会における本年度の特筆すべき動向としては、国際代替法会議の 2007 年日本開催を決定したこと並びに第 17 回大会において、将来的な ECVAM との共同研究を目指して ECVAM からの講演者を招待したこと、代替法開発の促進を求める参議院議員を招待したことが挙げられる<sup>16)</sup>。なお、日本動物実験代替法学会には、評価委員会とバリデーション委員会とが組織として設置されており、評価委員会は、本厚生労働研究班から委託された『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』の評価の実務を担当している。一方、バリデーション委員会は、『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』の施設間バリデーションを実施中である。また、『市販キットである 3 次元皮膚モデルを用いる皮膚刺激性試験代替法』の施設間バリデーションの結果を解析中である<sup>16)</sup>。

今回、本厚生労働研究班に代替法としての評価を希望する試験法として、非 RI-LLNA 法が提案されてきている。この提案は化粧品に関連する企業からの提案ではないことから、他の産業界における代替法の開発が促進されてきたこと並びに本厚生労働研究班の目指す代替法評価機関(仮称:JaCVAM)設置に向けた動きが加速することを期待したい。

いずれにしても、代替法の開発と評価については、国際協力が必要であり、その受け皿としての評価機関(JaCVAM)の設置や評価機関における成果がガイドライン等の作成に直接結びつくようなルート構築が必要であろう。

#### C-3) 資生堂から提案された光毒性試験代替法バッテリーの評価

申請法は被験物質による寒天ゲル中での酵母の発育阻止円に対する太陽光近似光の影響と赤血球の溶血反応に対する太陽光近似光の影響とを組み合わせた方法である。この方法について申請データを基に以下の点について、詳細な検討を行った。

- ①提案は評価に値するか？
- ②開発コンセプトの妥当性
- ③OECD ガイドライン案に記載されている 3T3-NRU 光毒性試験法との比較
- ④評価できる光毒性発現機序は？
- ⑤被験物質の適用範囲の妥当性
- ⑥SOP の妥当性
- ⑦試験の容易性
- ⑧実施されたバリデーションの種類
- ⑨バリデーションで使用した被験物質の妥当性
- ⑩データの信頼性
- ⑪再現性
- ⑫in vivo データの妥当性
- ⑬In vivo データとの対応性
- ⑭試験法の頑健性
- ⑮判定基準の妥当性
- ⑯動物福祉面からの妥当性
- ⑰コストからの妥当性
- ⑱その他

その結果、提出データに若干の誤記があったが、全体として、データの信頼性に問題なく、提案された試験法には以下の様な利点があり、光毒性の有無を判断することを目的とする化学物質のスクリーニングに有用と思われた。但し、多施設バリデーションを実施して、その結果を見て最終的な総合的評価を行うべきであるとされた。

#### 試験法の利点

- ① 実験方法に培養細胞を用いていないので試験法が比較的簡便である。
- ② 水難溶性物質に対しても適応可能である。
- ③ 化粧品や化粧品原料だけでなく、広く一般の化学物質にも使用可能である。
- ④ 特性の異なる 2 種の試験法の組合せによって異なる毒性機序に基づく光毒性を検出可能である。
- ⑤ 光毒性物質の予知の際に最も困る偽陰性は出なかった。

なお、提案された試験法で捉えられるものは光増感作用のある物質である。光感作性については、この試験法で陽性と評価された物質を光蛋白結合性等の他の試験法で評価することが必要と考える。また、3T3-NR 法も含め、これらの試験系で陽性結果が得られた物質を産業的に利用する場合には、リスク評価を行うための試験が必要となる。

多施設バリデーションを実施する際には、他の施設が誤解することがないように SOP

の詳細を検討する必要がある。また、提案された方法が適切か否かを判断する場面では、3T3-NR 法と比較されることになることから、バリデーション研究の結果として明確な結論を導くためには、同様の条件下で NR-3T3 法を同時に実施することが望ましいが、参加施設への負担をも考慮し判断すべきである。

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とのバッテリーを組む必要性については、その理論的背景と実際のデータの両面からの疑問が十分払拭されておらず、更に検討する必要がある。

なお、多施設バリデーションの際に提案者の SOP を、評価委員会やバリデーション委員会が、提案者の了解を得ずに、勝手に変更する事は許されないことを確認した。

また、実行すべき多施設バリデーションについては、in vivo 試験結果との対応性について詳細な検討を行うためには多数の被験物質が必要であるが、それは実施困難であり、バリデーションの目的を提案された施設内バリデーション結果の信頼性確認と施設間再現性の評価とし、被験物質の数や種類を絞るのが適切とされた。即ち、過去のデータを基にクリティカルな被験物質（明確な陽性、陰性、境界領域、ばらつきや誤評価の多かったもの等）を選択し、なるべく少数で結論が得られる事が重要であるとされた。

#### C-4) 多施設バリデーションの結果

バリデーション実施機関より酵母光生育阻害試験では本試験と予試験合わせて 228、赤血球光溶血試験では同じく 192 のデータファイルが提出された。これらについて妥当性について検討し、前者では 39、後者では 183 のファイルについて疑義があり、試験実施施設と連絡をとり、必要な修正を行った。この後データを確定し、被験物質コードを開示した。

施設内再現性については繰り返し実験において、陽性対照物質の結果から判断した。酵母光生育阻害試験において、陽性対照物質 8-MOP は 1 施設で 1 回陽性対照であると判定できず疑陽性と判定された。それ以外の施設はすべての試験で陽性と判定された。赤血球光溶血試験においては陽性対照物質 acridine は全ての施設と試験で陽性と判定された。

システムとして再現性については、1 施設

を除けば、ほとんどの施設において繰り返し実験で判定が変わることはなかった。今後、再現性の悪かった施設における原因を検討する必要がある。

バッテリーシステムでの判定結果の施設間再現性は acridine, chlorhexidine, bithionol、及び 4-5-butyl-4-methoxydibenzoylmethane において、すべての施設で判定が一致した。SLS と 6-methylcoumarin は1施設で他の3施設と異なった判定が下された。一方、anthracene、amiodarone、chlorpromazine については2施設の判定が他の2施設の判定と異なった。一方、赤血球光溶血試験での測定波長を 520-525nm としたときの判定結果は acridine, chlorhexidine, chlorpromazine、bithionol、及び 4-5-butyl-4-methoxydibenzoylmethane で測定結果が全ての施設で一致し、amiodarone の判定は2施設が陽性であったが他の施設は疑陽性と陰性であった。他の3物質 (anthracene, SLS, 6-methylcoumarin) については1施設のみ判定が他の3施設と異なっていた。

バッテリーシステムでの判定と in vivo 判定との一致性については以下の表に示したように溶血度の測定のための波長を 530-535nm とした時に感度が高かったが、モルモットで光毒性陰性物質を陽性とするのがあった。

表C-1: バッテリーシステムでの判定結果と施設間再現性 (%)

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度Ⅰ	100	0	67	67	50	100	63.9
感度Ⅱ	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致性	67	0	67	50	50	67	50.0

感度Ⅰ：陽性物質を陽性と判定したか

感度Ⅱ：陽性物質を陽性或いは疑陽性と判定したか

特異度：陰性物質を陰性と判定したか

一致性：判定の in vivo 結果との一致性

溶血性を540nmで測定

表C-2: バッテリーシステムでの判定結果と施設間再現性 (%)

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度Ⅰ	100	67	67	67	100	100	83.3
感度Ⅱ	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致性	67	33	67	50	67	67	58.3

表の説明は表C-1と同じ。

溶血性を520-525nmで測定

### C-5) 皮膚吸収性試験

#### C-5-1) ヘアレスラット腹部皮膚の TEWL

強い圧力 (200 g/cm<sup>2</sup>) で tape stripping を行ったとき、4 回目の stripping で最も高い値を示し、2 回目の stripping では、サンプル間で大きなバラツキが見られた。stripping 後のテープ観察結果では、角質層の不均一な剥離が見られ、stripping 4~6 回目の間に角質層はほとんど除去されていた。これらの結果は前回の報告結果と一致する。

同様に、弱い圧力 (5~10 g/cm<sup>2</sup>) にて tape stripping を行ったときの角質層剥離状態を見ると、強い圧力を用いたものと異なり、初期の stripping 回数において、角質層の部分的欠損は認められず、また、完全除去するのに多数回の stripping を要している。弱い圧力での tape stripping は、角質層の剥離が均一といえるほどではないが、垂直方向の剥離は起きにくいものと思われる。

TEWL は 6 回目の stripping まではさほど変化せず、サンプル間のバラツキもほとんど見られなかった。その後はバラツキを伴うようになるが、TEWL の上昇パターンは各サンプルで類似していた。

#### C-5-2) ブタ耳皮膚の TEWL

ヒト皮膚代替モデルとして有望であると報告されているブタ耳皮膚 Intact skin では、ヘアレスラットよりも TEWL 値がばらついた。これは耳摘出時、あるいは搬送時に角質層にダメージを負ったものと考えられる。ブタ耳皮膚は強い圧力でテープを適用しても、均一な角質層の剥離が見られ、TEWL の一定な上昇パターンが見られた。また、弱い圧力でテープを適用したときの TEWL 値の上昇パターンは、サンプル間で良好な一致性を示した。

#### C-6) 三次元皮膚培養細胞モデルを用いた皮膚吸収性試験

コラーゲンゲルに培養して線維芽細胞と角質細胞を 11 日培養して作成した三次元培養皮膚モデルは角化細胞(A431 細胞)が増殖し、階層的に角化細胞が層積され、角質(horny layer)が形成されていることが観察された。角化細胞の下層にはコラーゲンゲル中で裏打ち細胞として最初に培養された線維芽細胞が観察された。この三次元培養皮膚モデルを Franz 型拡散セルに装着し、透過試験用原液 1.0 mL を donor 側に加え、32°C で 0.5~3 時間に receptor 側に透過してくる benzoic acid (BA), Resorcin (RN) および Salicylic acid (SA) の各時間毎の累積透過量を測定した。その結果、BA、RN および SA の透過速度は、それぞれ、45.5, 16.1 および 35.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$  であった。lag time はほぼ 0 であった。また、MP、EP および CC の透過速度は 26.7, 26.7 および 29.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$  であった。methyl p-oxybenzoate (MP)、ethyl p-oxybenzoate (EP) および 4-chloro-m-crezol (CC) の lag time はほぼ 0 時間であった。

同様に Franz 型拡散セルに装着したコラーゲンスポンジ上に培養した裏打ち細胞の線維芽細胞及びその上に構築した角化細胞膜の三次元培養皮膚モデルを用い、BA、RN および SA の透過速度を求めたところ、それぞれ 75.8, 28.4 および 54.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$  であった。lag time は、0.16, 0.18 及び 0.15 時間であった。また、MP、EP および CC の透過速度は 44.2, 44.5 および 46.2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$  であった。MP、EP および CC の lag time は、0.05, 0.1 および 0.13 時間であった。

三次元培養皮膚モデルおよびモルモットの腹部剥離皮膚を用いた時の透過速度の比較したところ、コラーゲンゲル上に作成した三次元培養皮膚モデルを用いての透過指標物質の透過速度に比べ、コラーゲンスポンジ上に作成した三次元培養皮膚モデルでの透過速度は大きな値を示していた。一方、モルモットの腹部剥離皮膚を用いた透過指標物質の透過速度と三次元培養皮膚モデルでの透過速度の間に類似の傾向が観察されなかった。同様に、透過指標物質の質量分布比の間にも相関関係が観察されなかった。これらの結果より、三次元皮膚培養モデルを実験動物代替法の動物の皮膚モデルとして、物質の透過実験に用

いることは困難であることが明らかになった。

#### C-7) 細胞を用いる代替試験法の開発

##### C-7-1) 既存化学物質の代謝と細胞毒性

調査した 183 化学物質中、S9-、S9+ の条件下で共に細胞毒性を示さない物質は 48 物質(26.2%)あり、これらの物質は最高濃度 (5 mg/kg もしくは 10 mM)においても生存率が 70%以上を示した。その大部分は動物を用いる単回投与や反復投与毒性試験においても低い毒性を示した。

S9-、S9+の条件下で同程度の毒性を示す物質は 34 物質(18.6%)であった。これらの物質はラット S9 添加によっても代謝されず代謝が絡まない物質であることが推測された。動物を用いる試験結果においても約 50%程度は弱い毒性値を示した。

S9+で毒性が強くなる、いわゆる、代謝活性化されて毒性が発現する物質は 43 物質(23.5%)で、そのうち 22 物質(12.0%)は S9-で毒性が認められなかった。

S9+で毒性が弱くなる物質は 58 物質(31.7%)で、そのうち 12 物質(6.6%)は S9+で毒性が認められなかった。S9+と S9(-)条件下で得られた  $\text{IC}_{50}$  値の比較では、S9mix を加えた場合と加えない場合で  $\text{IC}_{50}$  値に 400 倍の開きがある物質もあった。

##### C-7-2) 代謝系導入における諸条件の検討

96 ウエルプレートを用いるニュートラルレッド取り込みを指標とする試験法を適用することで、少量の S9 反応液と化学物質で試験を実施する事ができた。しかしながら処理条件については下記のような結果が得られ、更に今後も条件検討が必要である。

##### 細胞種と S9mix の組成

染色体試験に用いている S9mix の組成を用いる事により効果的な代謝活性化能が認められた。一方、用いる細胞種と組成の異なる S9mix、すなわち、染色体試験用の S9mix I と MLA 用の S9mix II では毒性反応に大きな違いが見られた。

##### S9 の濃度と処理時間

S9 濃度と処理時間に関する 6 種の化学物質の毒性反応は、CP の様に S9 を添加することにより代謝を受け顕著に毒性が発現する物質から、MMS のように S9+と S9-間で毒性にそれほど差が見られないものなど、化学物質によりその反応は多様であった。既に報告されているように、それぞれの化学物質に

よって代謝に最適な S9 濃度は異なる事が本実験によっても再現できた。即ち、S9 濃度と細胞毒性の強さの関係は BP, MCA では、 $0\% < 2\% < 5\%$ 、AFB1, CP では  $0\% < 5\% < 2\%$ 、NDMA, MMS は  $0\% < 2\% < 5\%$ であった。一方、化学物質と S9mix の処理時間は、3時間処理よりも 6 時間処理でより強い毒性を示すものが認められた。この結果より、一般的には 6 時間処理が適当と考えられるが、ヒトリンパ球のように細胞によっては 6 時間処理で S9 に対する毒性が発現する場合がある事から、事前に用いる細胞の S9 に対する反応は調べておく必要がある。

#### 化学構造と毒性反応

既存化学物質の CHL 細胞を用いる試験データにおいて 4-aminophenol は S9-で毒性が強く、代謝の系では毒性が 10 倍程度弱くなる事が報告されている。BALB/c 3T3 細胞を用いる本試験系においても同様に顕著な毒性の差が見られた。しかしながら、類縁構造を有する 3-aminophenol の毒性に関しては、既存化学物質の CHL 細胞を用いる試験データにおいて、CHL 細胞では S9+の条件では毒性が強くなる事が報告されている。しかしながら、BALB/c 3T3 細胞を用いた本試験の結果では S9+と S9-でさほど差が見られず、むしろ S9+の条件で毒性が軽減していた。4-aminophenol と 3-aminophenol に関してはアミノ基の位置によって毒性に差があることから、その構造により代謝され易さに差があると考えられる。

#### 培地に含まれる血清の影響

化学物質を S9mix を含む処理培地とともに細胞に処理する場合、その処理培地に通常細胞培養に添加する FCS を含むか含まないかで毒性に差が出てくる可能性がある。CHL 細胞と BALB/c 3T3 細胞について血清の影響を 3-aminophenol の毒性反応で調べた。その結果、両細胞ともに血清の有無により結果が異なり、特に CHL の場合、血清無添加ではより低濃度域に毒性がシフトした。BALB/c 3T3 細胞では 10%血清添加より無添加の場合の方が毒性に差がみられた。またこの際、血清を添加した培地の CHL 細胞と血清無添加の BALB/c 3T3 細胞では、S9mix II よりも染色体試験に用いる S9mix I の組成で毒性が明瞭になった。化学物質と血清中のタンパクの結合、血清中の薬物代謝関連因子の作用などが考えられる。

#### D. 考察

昨年度末に公布された「動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止に最終期限を設けた EU 化粧品指令第 7 次改正」の各国批准と法制化が進められる年として、EU 各国及び関連団体の動きが注目される年であった。この化粧品指令第 7 次改正の公布により、現在使用可能な代替法と今後開発の必要な代替法が明らかとなり、それらの課題への幾つかの対応が開始された。まず、現在使用可能な代替法に関する対応としては、化粧品の安全性評価に係わる SCCNFP や危険物質指令に係わる ECB が関係するガイドラインの見直しを開始し、代替法の導入が計られた。また、ECVAM が重点項目を再編成し、ICCVAM との共同研究体制を定着させた。

本邦においては、本厚生労働研究班が国会レベルで認識されたこと、また、ECVAM との国際的共同研究へ一歩踏み出した。本厚生労働研究班は本年度で終了するが、今後、国会レベルの認識により関連する新規厚生労働研究班への支援強化が期待されるとともに、ECVAM を仲介に ICCVAM との連携を含めたグローバルハーモナイゼーションの促進が期待される。また、このグローバルハーモナイゼーションを考えると、その核となるべき、行政認知の本邦独自の代替法評価機関 (JaCVAM) の設置が是非とも必要と考える。

一方、本年度は公的な承認がなされた新たな規試験法は、国内外を問わずなかった。このことは、これから開発すべき代替法の困難さを示しているものと考えられる。この課題を解決するためには、これまで代替法を開発してきた枠組みからの脱却と監督官庁の枠を超えた国家レベルでの積極的な研究支援が必要であろう。

TEWL を integrity の指標とするには、皮膚の段階的損傷に対して、測定値が定量的にそれを反映し、かつ、再現性のあることが必要である。テープストリッピングは皮膚角質層の損傷モデル作成法として一般的であり、皮膚に適用された薬物の角質層内濃度勾配を求める方法として皮膚外用剤の同等性試験に応用されている<sup>2)</sup>。この時、テープストリッピングによる角質層の剥離は、1 回に 1 層の均一なものであることが前提とされていた。すなわち、本研究において当初見られた TEWL のバラツキを、TEWL 測定に内在する問題点とみなし、テープストリッピングに起因するバラツキと考えなかったことに問題

があった。TEWL の測定値は湿度、温度さらには、プローブ周辺のわずかな空気の動きに影響される。我々は恒温・恒湿の部屋に空気の流れを遮断するための恒温箱を設置し、この環境下で TEWL を測定している。この条件での、ヘアレスラット腹部摘出インタクトスキンの TEWL は  $10.13 \pm 1.93 \text{ g/m}^2/\text{h}$  ( $n=15$ ,  $\text{CV}=19.12\%$ )、背部皮膚では  $9.64 \pm 1.68 \text{ g/m}^2/\text{h}$  ( $n=21$ ,  $\text{CV}=17.40\%$ ) であり、95%信頼区間の上限値は、それぞれ、 $13.99 \text{ g/m}^2/\text{h}$  と  $13.00 \text{ g/m}^2/\text{h}$  となる。これら皮膚を試験に用いる場合、この値を超える TEWL を示す試料については、試験に用いない、あるいは、得られた試験結果の解釈には慎重であるべきである。一方、今後、皮膚外用剤の試験試料として有望なブタ耳皮膚については、今のところ例数は少ないものの、 $15.11 \pm 3.21 \text{ g/m}^2/\text{h}$  ( $n=6$ ,  $\text{CV}=21.26\%$ ) である。このバラツキの原因として、納入されるまでに（飼育状態も含む）、皮膚に何らかの損傷を生じていることが考えられ、ブタ耳を試験試料として用いるためには、飼育施設の協力を得て、品質管理を行っていく必要がある。

現在、我々はヒト皮膚の TEWL 測定は行っていないが、ヒトインタクト皮膚についても TEWL 基準値を設定する必要がある。

#### E. 結論

- 1) 資生堂より提案された酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーを評価委員会で一次評価した結果、この方法が false negative が少なく被験物質の識別に有用な方法であり、水難溶性物質に適応可能であると思われた。そこで、日本動物実験代替法学会に多施設バリデーション実施を依頼した。
- 2) 多施設バリデーションについての結果の一次評価では、酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血性試験の結果、及びそれらのバッテリーとしての判定結果の再現性は1施設を除き比較的良いと思われた。特異度は低いが陽性物質を陽性或いは疑陽性と判定する感度は高かった。なお、溶血性試験においてヘモグロビン測定のための波長は 540nm よりも 520-525nm の方が成績が良かった。
- 3) 研究班では評価すべき動物実験代替法を募集していたが、平成15年度は皮膚感

作性試験代替法である LLNA 法の放射性物質を用いない方法(LLNA 変法)を評価することとされた。

- 4) ECVAM は、今後開発すべき試験法への取り組みを明確化させるために重点項目を再編成し公表するとともに、グローバルな共同研究体制を推進してきた。
- 5) EU では、危険物質指令に関わる欧州化学局 (ECB) や化粧品非食品に関する科学諮問委員会 (SCCNFP) が、安全性評価のために必要な試験項目と試験法を公開し、その中で現時点で適用可能な代替法を明確にした。
- 6) 米国では、新規試験法の評価を ICCVAM に提案するためのガイドラインの最新版を公開した。また、ICCVAM が承認した LLNA が EPA により採用された。さらには、ICCVAM と ECVAM の相互協力の流れは、確実に加速されつつある。
- 7) OECD については、in vitro 試験のための GLP 基準作成のための検討を行っている。
- 8) 本邦においては、本厚生労働科学研究班が国会レベルで認識されたこと、代替法評価機関としての実務を推進したこと及び ECVAM との国際的共同研究へ一歩踏み出したことが特筆される。なお、本研究班の結論が行政的なガイドライン等への採用に結びつかないという問題がある。本研究班の目的とする“動物実験代替法の開発と利用の促進”を図るためには、本邦においても、ECVAM や ICCVAM に匹敵する本邦独自の、行政認知の代替法評価機関 (JaCVAM) を設置し、ガイドライン化へと結びつけるシステム作りが急務である。
- 9) 今後、更に代替法の開発や評価を総合的に推進するためには、監督官庁の枠を超えた国家レベルでの積極的な研究支援が必要である。
- 10) 皮膚からの水分消失 TEWL は透過性試験に使用される皮膚の integrity を判断するための指標として適切と思われた。今後、ヒト皮膚を透過性試験に用いるための TEWL 基準値を設定する必要がある。
- 11) コラーゲンゲルあるいはコラーゲンスポンジ上に作成した三次元培養皮膚モデルにおける薬物透過速度は SA ではモルモットに近かったが、検討した他の5種類の薬物ではモルモットの剥離皮膚よりかなり高い透過速度与えた。このように、

透過のパターンがモルモットの剥離皮膚での透過速度と大きく異なることから、三次元皮膚培養モデルを実験動物代替法の動物の皮膚モデルとして、物質の透過実験に用いることは困難であると考える。

- 12) 細胞毒性試験における代謝活性化系について検討し、MLA 用の S9mix よりも染色体試験に用いているものの方が効果的であった。細胞については、BALB/c 3T3 細胞よりも CHL 細胞が化学物質に対する毒性反応が良くあらわれた。最適 S9 濃度は化学物質によって異なった。また、血清の有無も細胞毒性発現に影響を与えた。

#### F. 引用文献

- 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026-0035
- 2) The Rose Sheet Vol.24 No.34, p.7 (2003)
- 3) FRAME News, Issue No.55, August 2002
- 4)ATLA, 31, 473-481 (2003)
- 5)ATLA, 31, 87-87 (2003)
- 6)ATLA, 31, 379-379 (2003)
- 7)ATLA, 31, 471-471 (2003)
- 8)ATLA, 31, 551-551 (2003)
- 9) The SCCNFP'S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation (5th Revision) Adopted by the SCCNFP during the 25th plenary meeting of 20 October 2003. pp18-30
- 10) <http://ecb.jrc.it/testing-methods/contentl.html>
- 11) ICCVAM Guidelines for the Nomination and Submission of New, Revised, and Alternative Test Methods; NIH Publication No.03-4508, September 2003 (<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/subguide.htm>)
- 12) Federal Register Vol.68, No.220, 14/11/2003, p64636
- 13) CORROSITEX®: A Validated and Accepted Dermal Corrosion Test Method for Classifying Substances

According to the UN Packing Groups, October 2003 (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/corrode.htm>)

- 14) In vitro screening test methods for severe eye irritants (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/eyeirrit.Htm>)
- 15) ATLA, 31, 233-233 (2003)
- 16) 日本動物実験代替法学会第 17 回大会要旨集, 2003 年 11 月 7,8 日

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 大野泰雄ら、Balb/c 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告, JSAAE 2004 印刷中
- 2) Yasuo Ohno, The validation and regulatory acceptance of alternative methods in Japan. Proceeding of Fourth World Congress, 643-655, 2004
- 3) L. Muller, D.Blakey, K. L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. Macgregor, J. M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka and H. Yamasaki: Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results-report on initial activities of the IWGT Expert Group, Mutation Research 540:165-176(2003)
- 4) 渡辺美香、小林美和子、佐々木澄志、田中憲徳: V79 細胞を用いたコロニー形成試験における低 pH による重金属の細胞毒性作用の変化, 秦野研究所年報 26 : 14-18 (2003)
- 5) Agneta Rosengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten: The long-term foreign body reaction is not influenced by initial implant material cytotoxicity, submitted to Biomaterials & Biocompatibility (2004)
- 6) Kiyomi Ohmori, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Noriho Tanaka and Makoto Umeda: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, Mutation Res., 557, 191-202 (2004)

##### 2. 学会発表

- 1) 大野泰雄、最近の非臨床試験ガイドラインの動向\_特に急性毒性試験と in vitro 代替



法について、安全性評価研究会 2003 年春のセミナー (2003.5.17)

2) 大野泰雄、安全性試験の代替法としての In vitro 試験\_特に医薬品開発における応用一、安全性評価研究会 (2003.8.30)

3) 大野泰雄、近年の代替試験法の開発とその受け入れ状況、化学物質点検推進連絡協議会 (2003.9.3)

4) 大野泰雄、「動物実験代替法の国際情勢と我が国の取り組み」日本学術会議トキシコロジー研連講演会 (2003.12.3)

5) 赤石樹泰、中澤憲一、佐藤 薫、斉藤 洋、大野 泰雄、伊藤 芳久、Functional modifications of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels by 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, in cultured rat dentate granule cells. 第 77 回日本薬理学会総会、大阪(2004.3.8)

6) 大野泰雄、「動物実験代替法研究の重要性とその問題点」日本薬理学会シンポジウム「薬理学における代替動物実験の展開」第 77 回日本薬理学会総会、大阪(2004.3.10)

7) 宮島敦子、簾内桃子、酒見和枝、大野泰雄、尿素系農薬 Linuron のヒト培養肝細胞における薬物代謝酵素に及ぼす影響、日本薬学会年会(2004.3.29)

8) 若栗 忍、林久美子、田中憲穂：代謝活性化法による化学物質の簡易細胞毒性試験、第 16 回日本動物実験代替法学会大会、東京 (2002)

9) 豊田英一、“化粧品工業界における動物

実験代替法の取り組みの現状”、日本動物実験代替法学会第 17 回大会 市民公開フォーラム“わが国における動物実験代替法の取り組みの現状と将来”、2003 年 11 月 8 日

10) 足利太可雄、穂谷昌利、板垣宏、相場節也、豊田英一、“ヒト細胞株を用いる感作性試験代替法の開発”、日本化粧品科学会第 28 回学術大会、2003 年 6 月 5 日

11) 豊田英一、“欧州における化粧品規制と動物実験代替法の現状”、日本動物実験代替法学会第 16 回大会 フォーラム“動物実験代替法の国際動向”、2002 年 12 月 5 日

12) 森本雍憲ら、皮膚外用剤試験における TEWL 測定の問題点、第 19 回日本 DDS 学会 (2003 年 6 月、京都) (Official Journal of the Japan Society of Drug Delivery System, 302 頁, 2003 年 3 月)

H.知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### J. 謝辞

本研究の遂行にあたっては日本動物実験代替法学会の評価委員会(田中憲穂委員長)とバリデーション委員会(吉村 功委員長)、バリデーション参加機関、及びそれぞれに属する委員及び職員の方々のお世話になった。ここに感謝申し上げる。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）  
分担研究報告書

光毒性試験代替法の評価とバリデーション

分担研究者 大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所、薬理部長）

研究要旨

酵母生育阻害及び溶血性を指標とする *in vitro* 光毒性試験法についての申請データを評価委員会で詳細に検討し、申請データの信頼性が確認され、false negative が少なく、水難溶性の被験物質にも適応可能な方法であると評価され、多施設バリデーションを実施する価値があると判定された。6施設で9個の被験物質を用いた多施設バリデーションの結果の一次評価では1施設を除き再現性は比較的良く、陽性物質の識別率が高いと判定された。今後評価委員会等で更に評価を行う予定である。また、放射性物質を用いない皮膚感作性試験 LLNA 改良法及び皮膚三次元モデルを用いる皮膚腐食性試験が提案され、研究班での検討の結果、評価委員会で評価すべきとされた。また、動物実験代替法のバリデーション及び評価について ECVAM と協議し、協力関係を構築するとされた。

A. 研究目的

医薬品や化粧品の安全評価においては様々な動物実験結果が必要であるが、動物愛護の立場から、なるべく動物を使用しない試験法に置き換える事が要請されている。しかし、新しい方法に置き換えることにより臨床試験志願者や患者、また、一般消費者に不必要なリスクを負わせることは許されない。安全性評価の観点から、新しい方法が少なくとも従来の方法と同等か、あるいはそれ以上の能力をもつことが客観的に示されていなくてはならない。そこで、EU では代替法センター (ECVAM) を設立し、代替法の開発研究とそのバリデーションを行っている。米国では省庁横断組織である ICCVAM を設立し、代替法を文献的に評価し、同時にバリデーションも実施している。OECD では代替試験法の validation 及び行政的受け入れ基準を作成し、新たな代替法を積極的に受け入れている。また、ECVAM と ICCVAM は代替法の取り入れについて相互にハーモナイズする方向で協調しており、日本でも早急に評価センターを立ち上げ、欧米と連携する必要に迫られている。また、内分泌かく乱化学物質試験法や Toxicogenomics などの新しい毒性評価方法についても対応している。

このように欧米では行政機関が中心となって、代替法の開発・評価及び行政的受け入れを着実に進めており、我が国でもこれに対応する体制を整える必要がある。そこで本研究では科学的根拠に基づいて可能ならば化粧品や医薬品等の

評価のために動物実験代替法を導入することを目的に、代替法の開発研究と調査を行うとともに、新規代替法として提案された方法が行政的に取り入れることが可能か否か検討することとした。平成13年度においては、評価委員会と評価会議を設定し、代替法や統計学の専門家、毒性学者、および臨床医師により多面的かつ二段階で評価するための評価組織を構築し、光毒性試験代替法を評価委員会により一次評価を行った。平成14年度は臨床医師や毒性専門家を含む評価会議で二次評価を行い、公開シンポジウムで広く意見を求めた上で最終評価を行った。今年度は我が国独自に開発され、水溶性の低い被験物質にも適応可能と思われる酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験法バッテリーを評価した。

B. 研究方法

B-1) 光毒性試験代替法の評価

評価委員会は日本動物実験代替法学会の協力を得て、光毒性試験の専門家および ICCVAM での評価に協力した経験を有する専門家、および統計専門家により構成した。評価委員会では資生堂より提案された酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーについて、提案者から提供された試験法 SOP（添付資料1）、バリデーションデータ、公表論文、生データ等を基に4回の会議を催し、詳細に検討した（添付資料2）。

評価委員会および評価会議の委員を以下に

示す。なお、提案資料には多施設でのバリデーション結果が行われていなかったことから、評価会議はそれらがそろい、再度評価委員会で評価した後に開催すべきと考え、今年度は開催しなかった。

#### 評価委員会

##### 委員長

田中憲穂（食品薬品安全センター・秦野研究所）

##### 委員

板垣 宏（資生堂・安全性分析センター）

今井弘一（大阪歯大学・歯科理工学）

大野泰雄（国立衛研・薬理部）

大森 崇（京都大学・医学研究科）

岡本裕子（コーセー基礎研究所）

小島肇夫（日本メナード化粧品・総合研究所）

畑尾正人（資生堂・基盤研究センター）

若栗 忍（食薬センター・秦野研究所）

なお、板垣委員は申請者でもあることから、会議においては情報提供のみ行い、審議には参加しなかった。

#### 評価会議

##### 委員長

大野泰雄（国立衛研・薬理部）

##### 委員

田中憲穂（食品薬品安全センター・秦野研究所）

豊田英一（日本化粧品工業連合会・技術委員会）

西岡 清（東京医科歯科大学・医学部）

林 憲一（厚生労働省・医薬局審査管理課）

溝口昌子（聖マリアンナ医科大学・皮膚科学）

宮地良樹（京都大学・大学院医学研究科）

森本雅憲（城西大学・薬学部）

吉村 功（東京理科大学工学・研究科経営工学）

なお、豊田委員は申請者の属する施設の上司であることから、審議には参画せず、日本化粧品工業連合会・技術委員会副会長の森福義（ポーラ化成工業）が代行することとされた。

#### B-2) 秘密の保持と評価結果の公表について

審議結果は公開シンポジウムや研究報告書等で公開することを前提にしている。しかし、個人情報事務局で保管し、公開せず、委員にも配布せず、必要に応じて口頭あるいは書面提示の上で説明するとされた。また、今回

の申請資料に掲載されたデータに基づいて今回の目的を越えて、利用、解析、公表する際には個別に申請者に了解を得なければならないとされた。

#### B-3) 評価の行い方について

今回の申請では多施設によるバリデーション結果は添付されていないことから、評価委員会では、まず申請者により提出された申請内容を評価し、その結果多施設でバリデーションする必要性とその価値があるとされた場合には代替法学会にそれを依頼する。

#### B-4) 多施設バリデーション

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会（委員長：吉村 功）と協力し、多施設バリデーションを実施した。計画書は添付資料3に示した。

#### B-4-1) SOP の作成

評価委員会のコメントを尊重し、提案者が提案法を若干修正し、当研究班の主任研究者である大野及びバリデーション委員会の了承を得た（添付資料4）。なお、陽性対照物質は酵母光生育阻害試験では 8-methoxypsoralen (8-MOP)、赤血球光溶血試験では acridine を用いた。

#### B-4-2) 被験物質、試薬および器具

動物或いはヒトでの光毒性の有無が示されており、EU/COLIPA のバリデーションで用いられた物質及び提案者の歴史データとしてモルモットでの光毒性の有無が確認されている物質の中から光毒性陽性物質を4品目 (anthracene, amiodarone, chlorpromazine 塩酸塩, acridine)、陰性物質5品目 (chlorhexidine, bithionol, sodium lauryl sulfate (SLS), 6-methylcoumarin, 4-5-butyl-4-methoxydibenzoylmethane) を選考した。なお、bithionol と 6-methylcoumarin はモルモットでは陰性であったが、EU/COLIPA の報告ではヒトで陽性とされたものである。陽性対照以外の被験物質は各施設6品目ずつ配布し、それぞれの被験物質について4施設で評価できるように計画した。薬物コードと実験施設との割付表は吉村委員が作成し、被験物質のコード化と割付および配布は大野が行った。コードは試験が終了し、データ提出を確認した後、大野より開示された。

陽性対照物質や被験物質、及びマイクロブ

レート等の器材は国立衛研より同一ロットのものを参加施設に配布した。

光源は全ての参加機関で EU/COLIPA のバリデーションと同じ Dr. Hönle 社の太陽光シミュレーター(SOL500)を用いた。

#### B-4-3) 参加施設

日本動物実験代替法学会のニュースレターを通じて参加施設を公募した。参加施設は資生堂（穂谷昌利、森眞輝、板垣宏）、食品薬品安全センター秦野研究所（若栗忍、田中憲徳）、マルホ（土肥孝彰）、コーセー基礎研究室（岡本裕子、谷川浩子）、東洋ビューティ（藤田百合子）、及び日本メナード化粧品（長谷川靖司）の6施設であった。なお、バリデーション実行委員会が吉村委員を委員長として設置され、上記バリデーション参加者と京都大学の大森 崇、大鵬薬品工業の川端留美と日本メナード化粧品の小島肇夫、国立衛研の大野泰雄がバリデーションの運営と情報交換、データ解析にあたった。

#### B-4-4) 技術講習

実験担当者に対する提案者による技術講習と評価委員会委員によるデータの取り扱い等についての説明会を食品薬品安全センターで2日間にわたり実施した。

#### B-4-5) 試験の実施と結果の判定

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のそれぞれについて同じ濃度で2回繰り返し、それらの結果が大きく異なる場合は再度実験を行い、3回目の試験結果に近い結果と合わせて当該試験での評価とした。また、バッテリーとしての総合評価は下の表に示したように、いずれの試験においても光毒性陽性と判定された被験物質は光毒性陽性、疑陽性と陰性の組み合わせの場合は疑陽性、いずれの試験でも陰性の場合に陰性と判定した。

		赤血球光溶血試験		
		陽性	疑陽性	陰性
酵母光 生育阻 害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	疑陽性	陽性	疑陽性	疑陽性
	陰性	陽性	疑陽性	陰性

網掛け太字の部分が総合評価

#### B-4-6) データ解析

試験で得られたデータは京大（大森）と東京理科大（吉村）に送付され、データクリー

ニングの後、再現性や施設間差、光毒性の予測性等について解析した。この結果を更にバリデーション実行委員会で検討した。今回の報告はバリデーション実行委員会での予備的検討結果によるものであり、今後、この評価結果を評価委員会に提出し、再度評価する予定である。

#### B-4-7) その他

溶血度の測定のためのマイクロプレートリーダーの波長はヘモグロビンの吸収極大である 540nm とヘモグロビン変性による影響の少ない 520-525nm の2種類で測定した。また、試験は GLP 原則に則って SOP に定められた通りに実施するとともに、定められた様式に従って記録した。生データは5年間各施設に保管するとともに、そのコピーを国立衛研に提出し、適切と判断される時期まで保管することとした。

#### B-5) 評価すべき代替法の公募

日本動物実験代替法学会のニュースレター及びホームページで評価スキームを説明した上で、評価を希望する新しい動物実験代替法を公募した。

#### B-6) ECVAM との協力関係の構築

研究班員の豊田とともに、イタリアミラノ市郊外、イプスラ市にある ECVAM を訪問し、Thomas Hartung 所長に我が国の代替法のバリデーションと評価計画について説明し、協力関係の構築について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は動物実験代替法の開発を目的としており、動物福祉の向上に資するものである。動物実験データは既存のデータを用い、新たな動物実験は行わなかった。

### C. 研究結果と考察

#### C-1) 資生堂から提案された光毒性試験代替法バッテリーについて

##### C-1-1) 申請試験法についての申請者の説明

申請法は被験物質による寒天ゲル中での酵母の発育阻止円に対する太陽光近似光の影響と赤血球の溶血反応に対する太陽光近似光の影響とを組み合わせた方法である。この方法の特徴は以下のように要約される。

- ①被験物質の光刺激性の有無を判定するものであり、光感作性を判定するものではない。
- ②化粧品には水溶性の低い物質が多く、本法はそれらにも適用可能である。